

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

B80

This is to certify that the annexed is a true
copy of the following application as filed with this
Office.

DATE OF APPLICATION: May 18, 1988

PATENT APPLICATION NO. 63-121002

APPLICANT: MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL
CO., LTD.

Dated this day of , 198 .

Fumitake YOSHIDA
Director-General
PATENT OFFICE

Certificate No. HEI

APPLICATION FOR PATENT

May 18, 1988

The Director-General
The Patent Office

1. Title of the Invention: BIOSENSOR

2. Number of Claims for a Patent: 10

3. Inventors: Name: Shiro NANKAI
Address: c/o MATSUSHITA ELECTRIC
INDUSTRIAL CO., LTD.,
1006, Oaza Kadoma,
Kadoma-shi, Osaka, Japan.
(and three others)

4. Applicant: Name: (582) MATSUSHITA ELECTRIC
INDUSTRIAL CO., LTD.
Address: 1006, Oaza Kadoma,
Kadoma-shi, Osaka, Japan.
Akio TANII,
Representative Director

5. Agents: Name: (5971) Toshio NAKAO,
Patent Attorney
Address: c/o MATSUSHITA ELECTRIC
INDUSTRIAL CO., LTD.,
1006, Oaza Kadoma, Kadoma-shi,
Osaka 571, Japan.
(and another)

Communication Address: Tokyo Detached Office
of the Legal Section
Telephone (Tokyo) 437-1121

6. List of the annexed documents:

(1)	Specification -----	1 copy
(2)	Drawings -----	1 copy
(3)	Power of Attorney -----	1 copy
(4)	Duplicate of Application Form -----	1 copy

7. Inventors and Agent other than those mentioned above:

(1) Inventors: Name: Mariko KAWAGURI
 Address: c/o MATSUSHITA ELECTRIC
 INDUSTRIAL CO., LTD., 1006,
 Oaza Kadoma, Kadoma-shi,
 Osaka, Japan.

Name: Mayumi FUJITA
 Address: - do. -

Name: Takashi IIJIMA
 Address: - do. -

(2) Agent: Name: (6152) Shigetaka AWANO,
 Patent Attorney
 Address: c/o MATSUSHITA ELECTRIC
 INDUSTRIAL CO., LTD., 1006,
 Oaza Kadoma, Kadoma-shi,
 Osaka, Japan.

SPECIFICATION

1. Title of the Invention

BIOSENSOR

2. Scope of Claim for a Patent

(1) A biosensor for determining a substrate concentration in a sample solution comprising a base plate having an electrode system and a reaction layer having formed thereon a space including said reaction layer, said space being provided with an introducing port for introducing said sample solution into said space and a discharge port for discharging the gas in said space by inflow of said sample solution, said electrode system being equipped with at least an electrode for measurement and a counter electrode, an enzyme being carried on said reaction layer, a change in concentration of a substance in the reaction between said enzyme and said sample solution being detected with said electrode system to determine a substrate concentration in said sample solution.

(2) A biosensor as claimed in claim 1, wherein said electrode system comprises a plural set of electrode systems and reaction layers corresponding to said plural set of electrode systems and a common space are provided.

(3) A biosensor as claimed in claim 1, wherein said electrode system comprises a plural set of electrode systems and, reaction layers and spaces

corresponding to said plural set of electrode systems are provided.

(4) A biosensor as claimed in claim 1, 2 or 3, wherein said reaction layer is composed of an enzyme and a hydrophilic high molecular substance.

(5) A biosensor as claimed in claim 1, 2 or 3, wherein said reaction layer is composed of an enzyme, a hydrophilic high molecular substance and an electron acceptor.

(6) A biosensor as claimed in claim 1, 2 or 3, wherein the surface of a material constructing said space is hydrophilic.

3. Detailed Explanation of the Invention

Field of the Invention

The present invention relates to biosensors which can quantitatively determine a specific component in various trace sample solutions from the living body in a rapid and easy way with high accuracy.

As a system for readily performing quantitative determination of a specific component in a sample solution such as blood or the like from living bodies without requiring dilution, stirring, etc. of the sample solution, a biosensor described in Japanese Patent Application Laid-Open No. 61-294351 has been heretofore proposed (Fig. 10). In this biosensor, the electrode systems 52 (52'), 53 (53') and 54 (54') composed of carbon, etc. are formed on an insulating base plate 51 by means of screen printing, etc.; after providing an

insulating layer 55 thereon, the electrode systems are covered with a porous material 57 having carried thereon an oxidoreductase and an electron acceptor and the whole is integrated with a holding frame 56 and a cover 58. When a sample solution is dropped onto the porous material, the oxidoreductase and the electron acceptor are dissolved in the sample solution, whereby an enzyme reaction proceeds with a substrate in the sample solution and the electron acceptor is reduced. After completion of the reaction, the reduced electron acceptor is electrochemically oxidized and a substrate concentration in the sample is determined from a current level for the oxidation obtained in this case.

Problem to be solved by the Invention

In the foregoing conventional construction, the base surface including the electrode system is not always uniformly wetted so that air bubbles remain between the porous material and the base plate, whereby a response current is affected or its reaction rate is reduced in some occasion. Further when an ambient humidity is low, moisture in a sample solution evaporates off during measurement so that a change in response is observed.

Means for solving the Problem

In order to solve the foregoing problem, on an insulating base plate having provided thereon the electrode system and a reaction layer, a space including the reaction layer is formed and, an introducing port for

introducing a sample solution into the space and a discharge port for discharging a gas in the space by inflow of the sample solution are provided.

Function

According to the present invention, a disposable biosensor can be constructed so that a substrate concentration in a very small amount of the sample can be determined rapidly in an extremely simple operation with high accuracy.

Example

Hereafter the present invention is described by referring to the following examples.

(Example 1)

As one embodiment of the biosensor, a glucose sensor is explained.

Fig. 1 shows a perspective view of a disassembled glucose sensor prepared as one embodiment of the biosensor in accordance with the present invention. Fig. 2 shows an external view of the biosensor. Fig. 3 illustratively shows a cross-sectional view of the biosensor obtained when the biosensor shown in Fig. 2 is cut at the center into the length direction. In Fig. 1, a reaction layer 14 shown in Fig. 3 is not shown.

Hereafter a process for preparing the sensor is described.

Silver paste is printed on an insulating base plate 1 composed of polyethylene terephthalate by means of screen printing to form leads 2, 3 (3'). Next,

conductive carbon paste containing a resin binder is printed thereon. By drying with heating, the electrode system comprised of an electrode for measurement 4 and a counter electrode 5 (5') is formed. Furthermore, insulating paste is printed so as to partly cover the electrode system to make the exposed area of the electrodes definite and cover unnecessary part of the leads. By a heat treatment, an insulating layer 6 is formed.

Next, the exposed area of the electrode system 4, 5 (5') is polished and then heat-treated at 100°C for 4 hours in the air. After the electrode portion is thus constructed, 0.5 wt% aqueous solution of carboxymethyl cellulose (hereafter simply referred to as CMC) as the hydrophilic high molecular substance is spread onto the electrodes and dried to form a CMC layer. A solution of glucose oxidase (GOD) as the enzyme in phosphate buffer solution is spread thereon and dried to form a reaction layer 14 comprised of CMC-GOD layer. In this case, CMC and GOD form a thin layer having a thickness of several microns in a partly mixed state.

Next, three members of this base plate 1, a spacer 7 comprised of a resin plate and a cover 9 are adhered to each other in such a positional relationship between the respective members shown by broken lines as shown in Fig. 1 to integrate the sensor as shown in the external view in Fig. 2. Herein, the spacer has a

thickness of approximately 300 μm and takes a shape that the central part is cut off into a U-shape having a width of 2 (mm) and a length of 7 mm. The end of the cut portion becomes an introducing port 10 of a sample solution and the central part forms a space 8, when integrated. Furthermore, the cover 9 possess a hole having a diameter of 2 (mm) and forms a discharge port 11 when integrated.

When the introducing port at the tip of the glucose sensor constructed as described above is brought into contact with a glucose standard solution (200 mg/dl) which is a sample solution, the sample solution is introduced into the inside through the introducing port 10. In this case, the air in the space 8 is rapidly discharged through the discharge port 11 and at the same time, the space is filled up with the sample solution up to near the discharge port. As such, the sample solution rapidly spreads onto the electrode surface to fill up the space so that any remaining air bubbles are not noted.

This is believed to be because the sample solution would flow into one direction by providing the introducing port and the discharge port and due to the hydrophilic high molecular substance layer previously formed on the electrodes, wetting on the electrode surface would be improved so that the gas would be smoothly exchanged with the liquid.

Further by previously treating the surfaces of

the members constructing the space such as the cover, spacer, etc., with a surface active agent to render them hydrophilic, the sample solution can be introduced more smoothly.

On the other hand, the added sample solution dissolves CMC therein to render the liquid viscous. Glucose in the sample solution reacts with the enzyme by the action of glucose oxidase carried on the electrodes to produce hydrogen peroxide. Therefore, by applying a voltage of 1 V between the electrodes one minute after introduction of the sample solution, the electrode for measurement is polarized into the anode direction. By applying a voltage to the anode direction described above, an oxidizing current for the produced hydrogen peroxide is obtained. This current level corresponds to the concentration of glucose which is a substrate.

As an example of the response characteristic of the sensor constructed as described above, the relationship between a current level 5 seconds after application of voltage and a glucose concentration is shown in Fig. 4, A, indicating that a good response characteristic was obtained.

Further with respect to 30 glucose sensors having the same specification as described above, the same sample solution was tested with the sensors. A coefficient of variation was as good as about 5%.

Furthermore, influence by evaporation was

examined under humidity conditions of 30% and 80%, using 10 sensors each, and compared with the glucose sensor shown in Fig. 10 which was prepared in a conventional construction by way of trial. In the glucose sensors according to the present invention, the influence was negligible even after allowing to stand for 5 minutes. However, in the sensors having a conventional construction, the evaporation was higher by about 3% under the lower humidity condition 2 minutes after.

As described above, the glucose sensor of the present invention having the construction described above can rapidly absorb a trace amount of the sample solution into the reaction layer zone and can determine a glucose concentration in a simple and rapid way with high accuracy, without being affected by ambient humidity, etc.

(Example 2)

The procedure was quite the same as in Example 1 until the CMC-GOD layer was formed. Thereafter, a reaction layer composed of a CMC-GOD-electron acceptor layer was further formed thereon by the following method.

Potassium ferricyanide having a mean particle diameter of less than 10 μ m as an electron acceptor was dispersed in toluene using lecithin. The resulting dispersion was spread over the CMC-GOD layer. Then toluene was evaporated off to form the reaction layer composed of CMC-GOD-electron acceptor layer on the

electrode system followed by integrating with a spacer and a cover as in Example 1. Thus, a glucose sensor having the construction shown in Fig. 2 was obtained.

Next, a glucose standard solution was introduced through the tip portion of the sensor as described above. By applying a voltage of 600 mV between the electrodes about one minute after, potassium ferrocyanide produced by the enzyme reaction was oxidized on the electrode for measurement. A current level in this case was measured 5 seconds after application of the voltage. As the result, an extremely good linear relationship was obtained between the glucose concentration and the response current level, as shown in Fig. 4, B. Further using 30 sensors, a variation coefficient was examined. The variation coefficient was 2.6% with respect to the glucose standard solution and 3% with respect to the whole blood sample, which were extremely good. Further with respect to influence of evaporation, a test was carried out in a manner similar to Example 1 and similar effects were obtained, as described above.

In providing the introducing port and the discharge port in the example described above, in addition to the arrangement shown in Figs. 1 through 3, holes may be provided in the cover 9 and the base plate 1, respectively, and used as the introducing port 10 and the discharge port 11 as shown in the perspective view of

the disassembled sensor in Fig. 5 and in the external view in Fig. 6.

Furthermore, as shown in the perspective view of the disassembled sensor in Fig. 7, the spacer may be divided into two parts of 7 and 7' and the parts may be used as the spacer 8, and the introducing port 10 and the discharge port 11.

(Example 3)

The electrode portion shown in Fig. 8 was constructed in a manner similar to Example 1. That is, silver leads 3, 21, 22 and 23, counter electrode 5 corresponding thereto and three electrodes for measurement 41, 42 and 43 were formed on a base plate to construct three pairs of electrode systems possessing the counter electrode in common. Next, a reaction layer composed of CMC-GOD-potassium ferricyanide layer was formed around each of the electrodes for measurement in a manner similar to Example 2.

Then, a spacer and a cover were adhered to integrate them as in Example 1. Herein, the spacer is partly cut off into a "comb-like" shape and the cut portion forms a space 8. The space is divided into the respective electrode systems but is continuous as a whole to form a common space. Furthermore, the end becomes the introducing port 10.

In response to the space dividedly constructed on these respective electrode systems, three holes are

formed in the cover 9 to provide discharge ports 11, 12 and 13. When the introducing port 10 is brought into contact with a sample solution, the sample solution is rapidly introduced into the space, while discharging the air in the space through the three discharge ports.

A response to the glucose standard solution was measured with respect to the three electrode systems in a manner similar to Example 2 and its mean value was determined to make it a response level for one sensor. The test was performed with 30 glucose sensors having the same specification. The variation coefficient was as good as 2%.

In the disposable type sensor, it is important for improved reliability to minimize factors for error including a difference in electrode area of each sensor. The difference between the sensors forms a cause for causing a difference in error of measurement data on the same sample solution. However, as described above, measurement with higher accuracy can be rapidly achieved by providing a plurality of electrode systems for the same sensor and obtaining a mean value of the response levels.

Fig. 8 shows the embodiment having 3 pairs of electrodes but the present invention is not limited thereto and can further provide a large number of electrode systems. Furthermore, the shape of the space is not limited to those shown in the figures, likewise

the shape or arrangement of the electrode systems.

(Example 4)

Fig. 9 shows a variation of the construction having a plurality of the electrode systems. In a manner similar to Example 1 already described, silver leads 21, 22 and 3 and two pairs of the electrode systems comprised of electrodes for measurement 41 and 42 corresponding thereto and a counter electrode 5 in common were constructed on the base plate. Next, as in Example 2, after a reaction layer composed of CMC-GOD-potassium ferricyanide layer was formed on each of the electrode systems, a spacer 7 and a cover 9 were adhered thereto. Herein, the spacer has two holes which independently form spaces 81 and 82 and, discharge ports 11 and 12 corresponding to the holes and introducing port 10 used in common are provided in the cover.

With respect to the glucose sensor having the construction described above, as shown in Example 3, an average was taken from response values of two pairs of the electrode systems to the glucose standard solution and made a measurement value for one sensor. When 30 sensors having the same specification were tested, the variation coefficient was as good as 2.2%.

As such, in the sensor shown in Fig. 9, measurement can be made with higher accuracy. In addition, since the sensor possesses the independent spaces, different sample solutions can be measured with

one sensor or the sensor can be provided for measurement under different conditions in time, temperature, etc.

In the example described above, one hole was provided in the cover to make it a common introducing port but the present invention is not limited to this embodiment. It is important to construct the measurement system comprising a plural pairs of the electrode systems and a plurality of independent spaces. Therefore, two holes may also be provided and introducing ports to the respective spaces may be constructed.

In Examples 1 through 4 described above, one embodiment of preferred positional relationship between the introducing port and the discharge port connected with the space is illustratively shown in the drawings. The discharge port may also be used as the introducing port and the introducing port may be used as the discharge port. Furthermore, the spacers and the covers shown in the respective drawings are composed of independent materials but are not limited thereto. It is advantageous in mass production to form an integrated cover member with a shape of cover by means of molding or the like.

Further by rendering the surface of materials constructing the space hydrophilic, a sample solution was introduced more smoothly through the introducing port. The effect was obtained either by using hydrophilic materials or by previously treating the surface materials

constructing the space with a surface active agent to render them hydrophilic.

On the other hand, an interval between the base plate and the cover can be controlled by varying the thickness of spacer or the size of a portion corresponding thereto. However, when the interval is too large, a quantity of sample solution required for filling up the space becomes large and it is also disadvantageous to introduce the sample solution by capillary phenomenon. When the interval is too small, a resistance between the electrodes increases or a current distribution is distorted. From the foregoing, the interval is preferably in a range of 0.05 to 1.0 (mm), more preferably 0.1 to 0.5 (mm).

In the examples, CMC was used as the hydrophilic high molecular substance. As has already been stated, its role is to prevent influence of adsorbable substances contained in a sample solution adsorbed to the electrode on response, in addition to the smooth introduction of the sample solution.

As the hydrophilic high molecular substance, gelatin, methyl cellulose and the like can be used, in addition to CMC, and hydrophilic high molecular substances of starch, carboxymethyl cellulose, gelatin, acrylate, vinyl alcohol, vinylpyrrolidone and maleic anhydride types are preferred. These water-absorbing or water-soluble hydrophilic high molecular substances are

dissolved in a suitable concentration and the resulting solution is coated and dried to form a hydrophilic high molecular substance layer having a necessary layer thickness.

In the foregoing examples, the electrode system in which the electrode portion is comprised of two electrodes of an electrode for measurement and a counter electrode has been stated. However, by constructing the electrode system with three electrodes further including a reference electrode, the accuracy can be further improved. As materials for the electrode, carbon illustrated in the examples is suitable as a stable and inexpensive material but the materials are not limited thereto. Other noble metal materials and oxidized materials may also be used.

Further as the electron acceptor, though potassium ferricyanide used in the examples is excellent in stability and reaction rate, redox compounds such as quinone compounds or ferrocene compounds, etc. can also be used, in addition to potassium ferricyanide.

Furthermore, the oxidoreductase is not limited to glucose oxidase shown in the foregoing examples but various enzymes such as alcohol oxidase, cholesterol oxidase, etc. can be used.

Effects of the Invention

As described above, the present invention can provide a disposable biosensor which can rapidly

determine a specific component in a trace amount of various sample solutions in an extremely accurate and simple way, by forming the space including the reaction layer on a base plate having provided thereon the electrode system and the reaction layer and further providing the port for introducing the sample solution connected with the space and the gas discharge port. 4.

4. Brief Explanation of Drawings

Fig. 1 shows a perspective view of a disassembled biosensor which is one embodiment of the present invention. Fig. 2 shows an external view of the biosensor. Fig. 3 illustratively shows a cross-sectional view of the biosensor. Fig. 4 shows a response characteristic of the biosensor. Fig. 5 shows a perspective view of a disassembled biosensor which is another embodiment of the present invention. Fig. 6 shows an external view of the biosensor. Figs. 7, 8 and 9 show perspective views of disassembled biosensors which are other embodiments of the present invention. Fig. 10 shows a perspective view of a disassembled biosensor which is another embodiment of the prior art.

List of numerals appearing in the drawings:

1, 51	base plate
2, 3, 3', 21, 22, 23, 52, 53, 54	lead
4, 41, 42, 43, 53'	electrode for measurement
5, 5', 52	counter electrode
6, 55	insulating layer

7, 7' spacer
8, 81, 82 space
9, 58 cover
10 introducing port
11, 12, 13 discharge port
14 reaction layer
54' reference electrode
56 holding frame
57 porous material

Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney,
and another

Fig. 1

- 1 ... 基板 Base plate
 2, 3 ... サイ Lead
 4 ... 測定極 ← Electrode for measurement
 5 ... 対極 Counter electrode
 6 ... 絶縁層 ← Insulating sensor
 7 ... スペース Spacer
 8 ... 空間部 Space
 9 ... カバ Cover
 10 ... 導入口 ← Introducing part
 11 ... 排出口 ← Discharge port

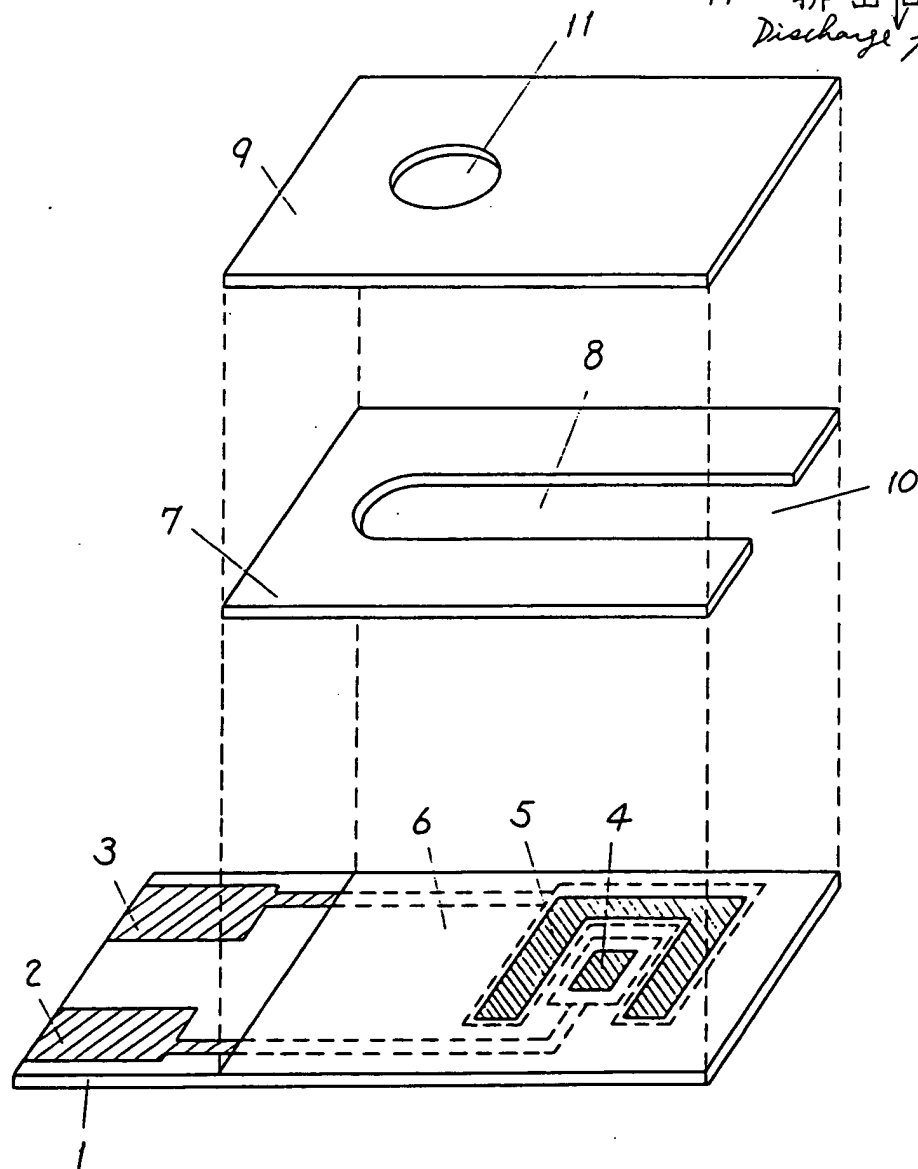


Fig. 2

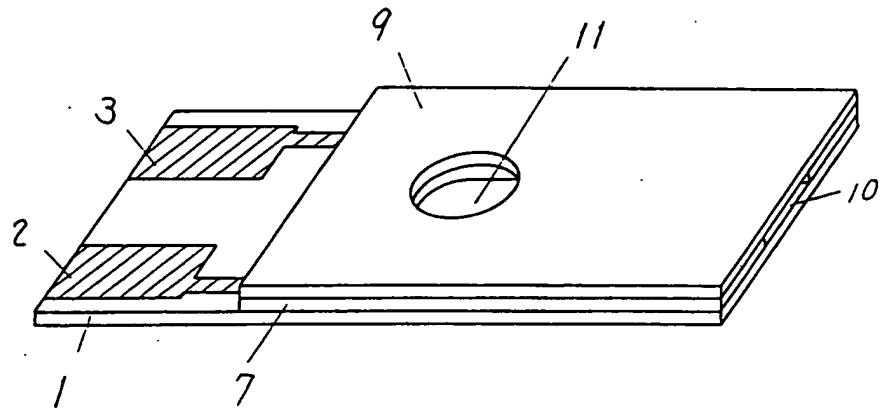
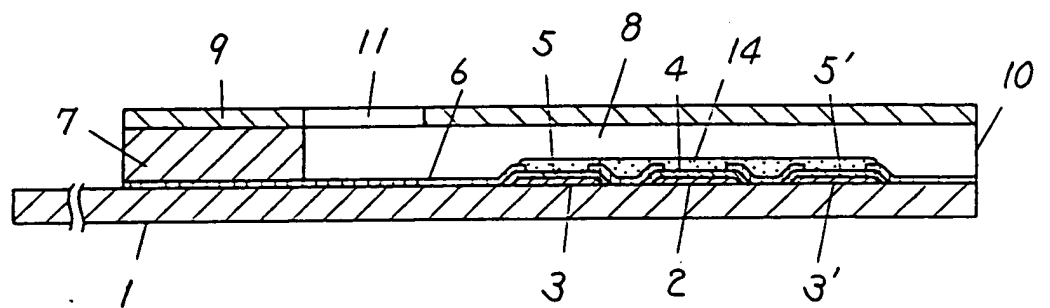
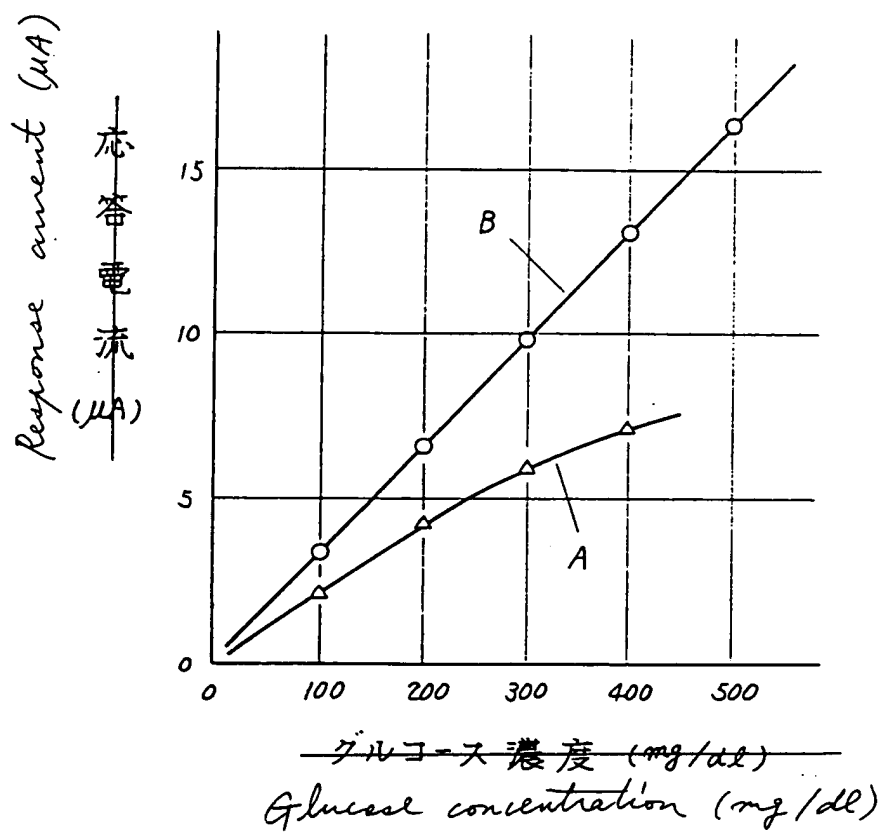


Fig. 3



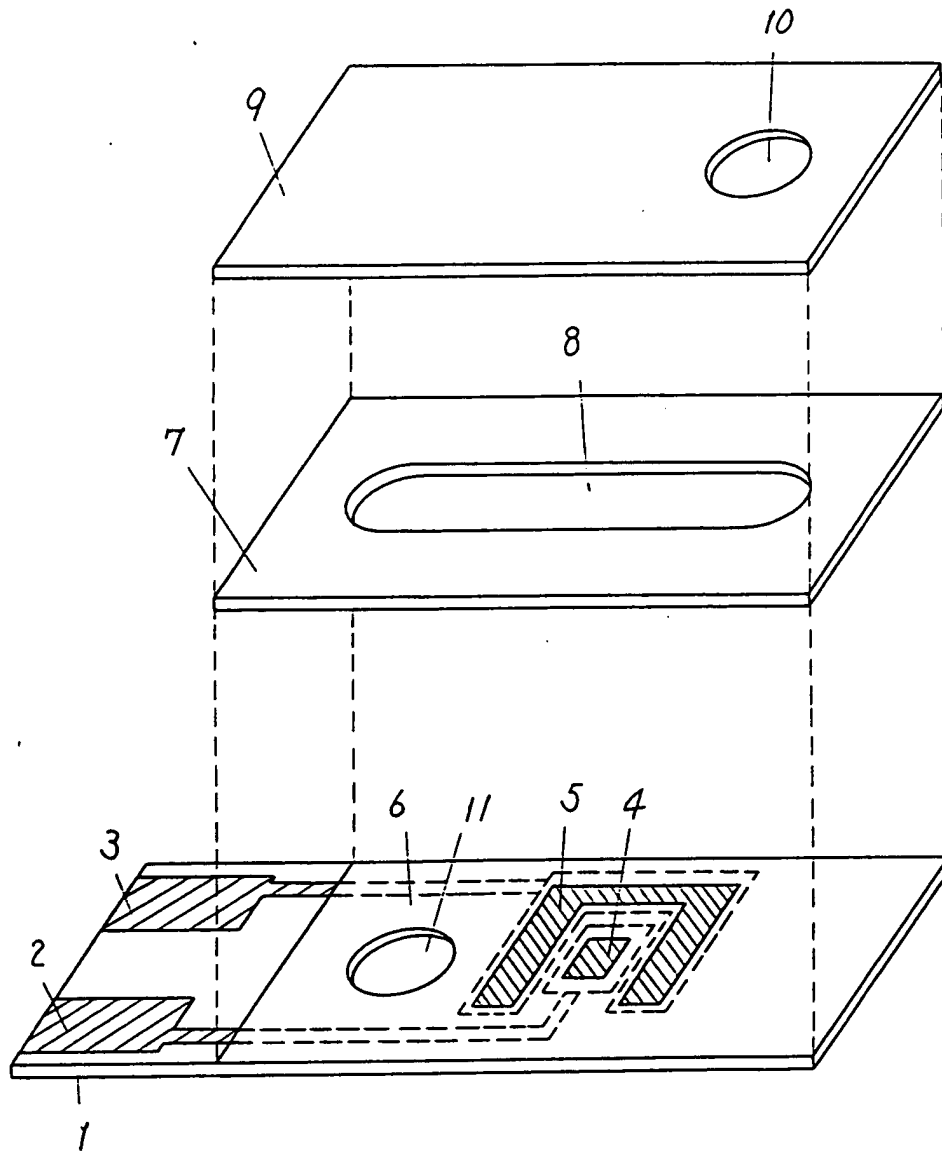
Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney, and another

Fig. 4



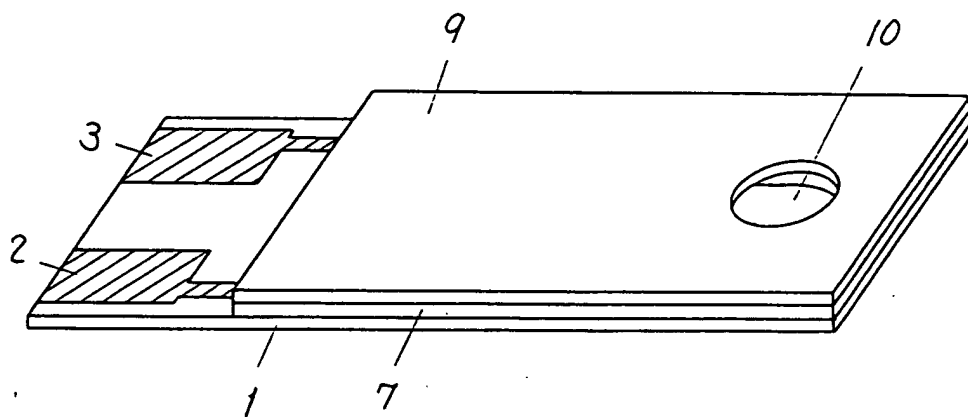
Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney, and another

Fig. 5



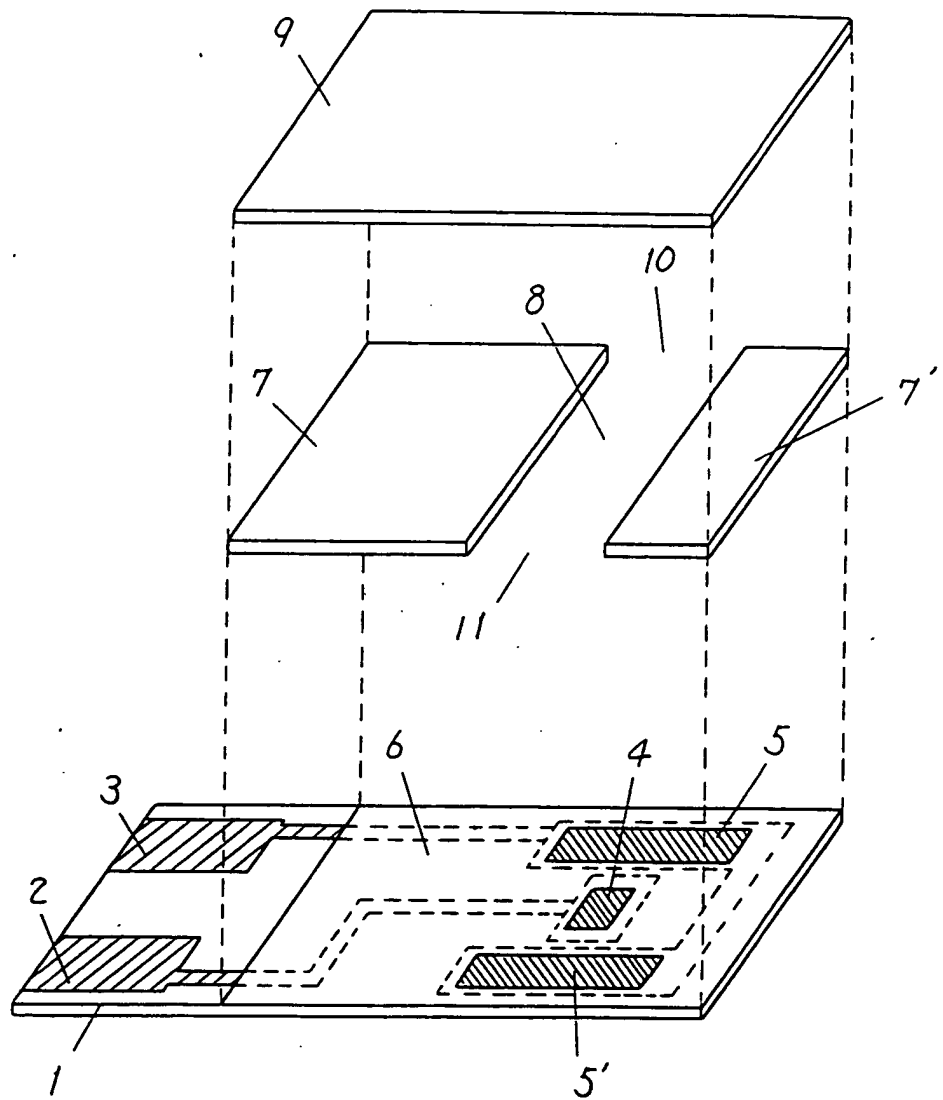
Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney, and another

Fig. 6



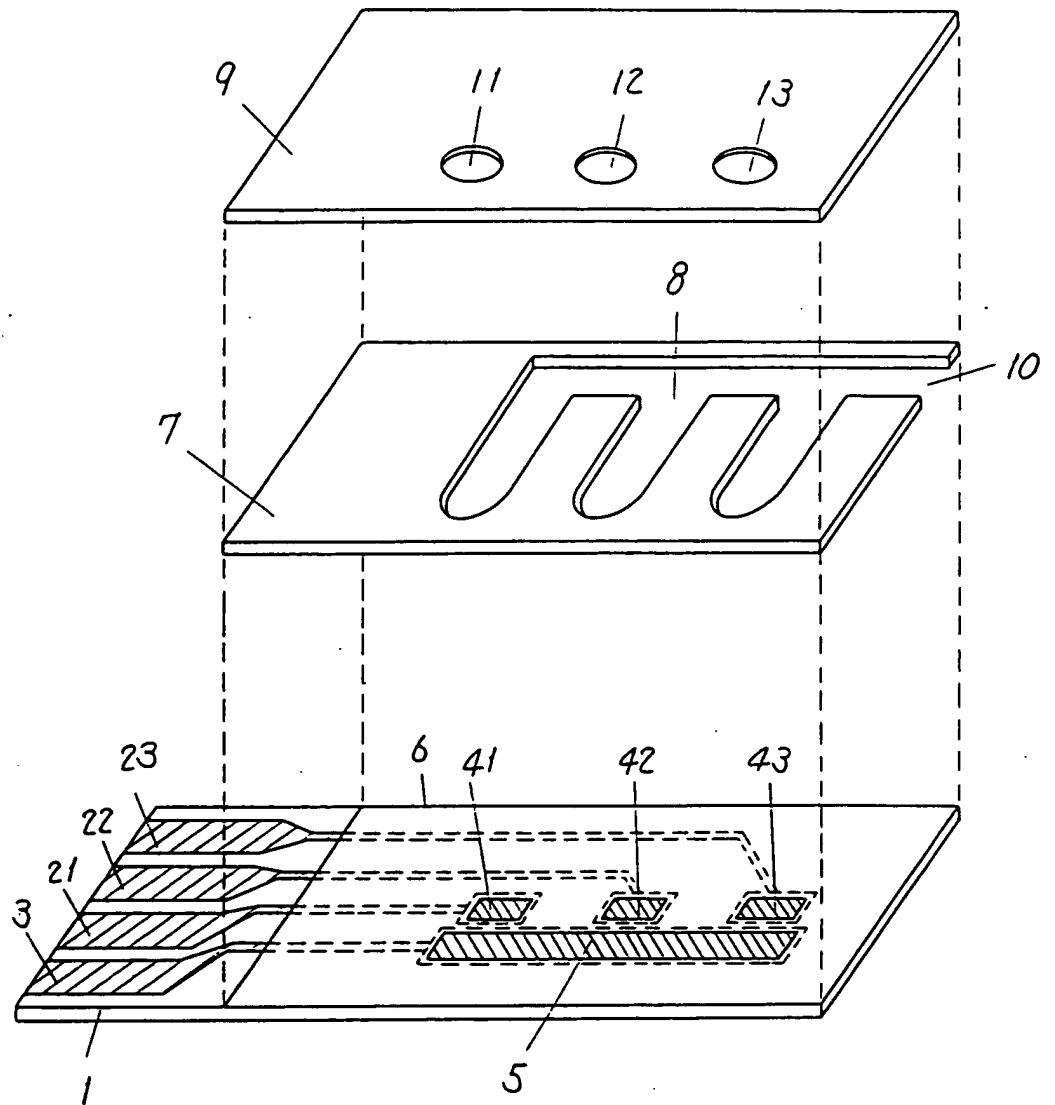
Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney, and another

Fig. 7



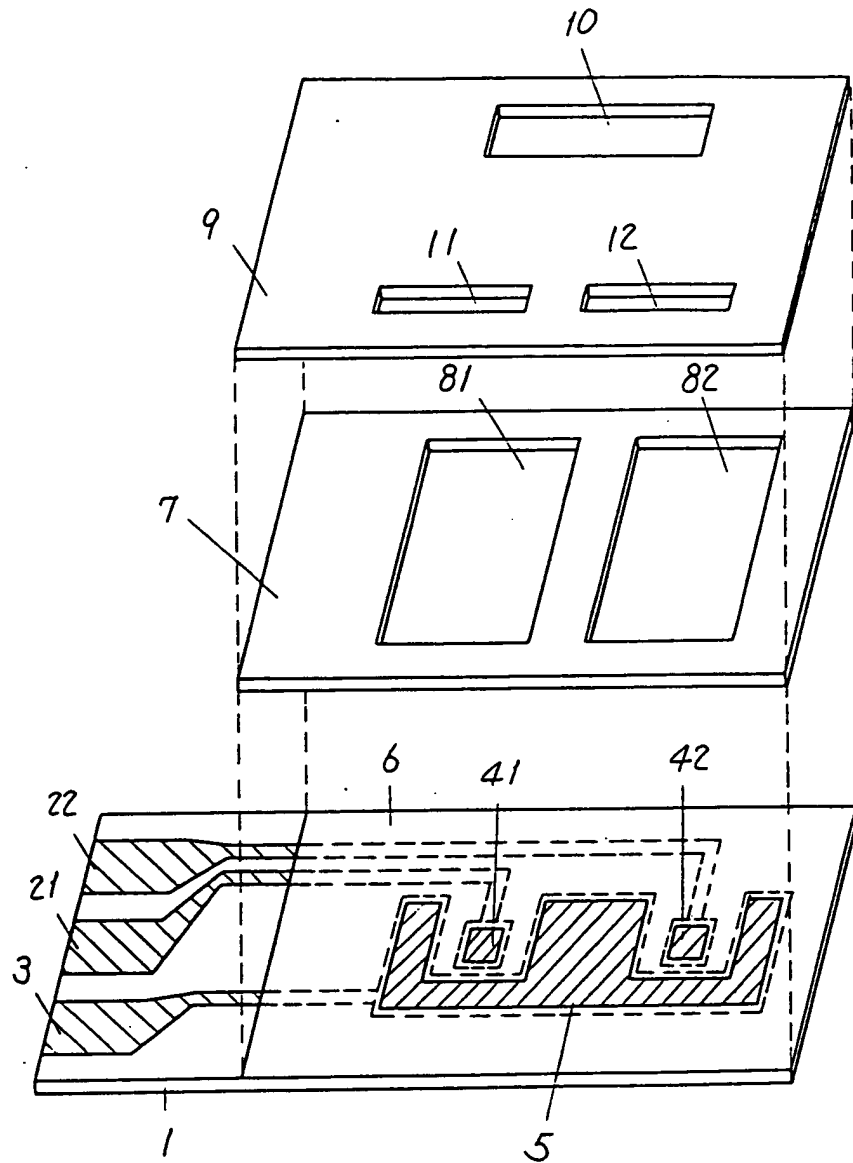
Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney, and another

Fig. 8



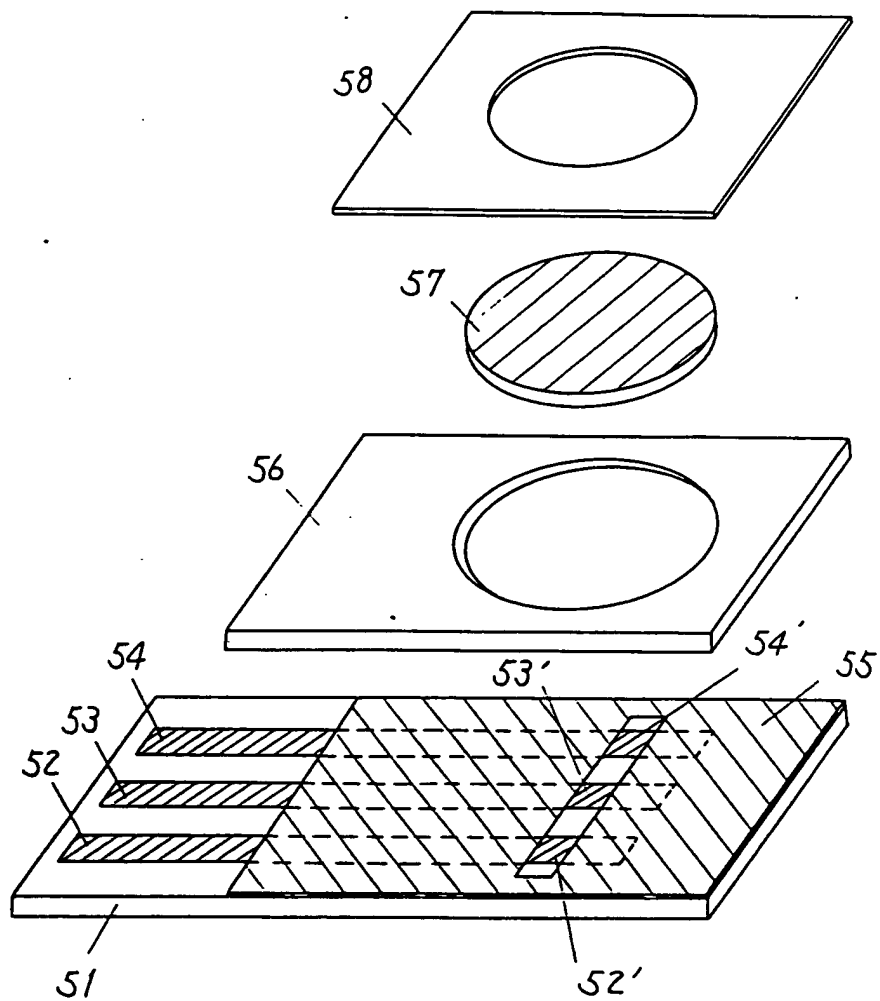
Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney, and another

Fig. 9



Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney, and another

Fig. 10



Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney, and another

I, Osahiko KUBO , a national of Japan,
c/o Asamura Patent Office of 331-340, New Ohtemachi
Building, 2-1, Ohtemachi-2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan,
declare that to the best of my knowledge and belief the
attached is a full, true, and faithful translation into
English made by me of Japanese Patent Application
No. 63-80842 attached thereto.

Signed this 19th day of December , 1989.



Osahiko KUBO

I, Osahiko KUBO , a national of Japan,
c/o Asamura Patent Office of 331-340, New Ohtemachi
Building, 2-1, Ohtemachi-2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan,
declare that to the best of my knowledge and belief the
attached is a full, true, and faithful translation into
English made by me of Japanese Patent Application
No. 63-121002 attached thereto.

Signed this 19th day of December , 1989.



Osahiko KUBO

⑫ 公開特許公報(A) 平1-291153

⑬ Int.Cl.⁴G 01 N 27/28
27/30

識別記号

3 3 1
3 5 3

庁内整理番号

7363-2G
J-7363-2G

⑭ 公開 平成1年(1989)11月22日

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全8頁)

⑮ 発明の名称 バイオセンサ

⑯ 特 願 昭63-121002

⑰ 出 願 昭63(1988)5月18日

⑱ 発 明 者	南 海 史 朗	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	河 栗 真 理 子	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	藤 田 真 由 美	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	飯 島 孝 志	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 出 願 人	松下電器産業株式会社	大阪府門真市大字門真1006番地	
⑳ 代 理 人	弁理士 中尾 敏 男	外1名	

明 細 書

1、発明の名称

バイオセンサ

2、特許請求の範囲

(1) 電極系と反応層を有する基板上に前記反応層を含む空間部を形成し、前記空間部に被検液を導入する導入口と、前記空間部の気体を前記被検液の流入によって排出する排出口を設けてなり、前記電極系は少くとも測定極と対極を備え、前記反応層には酵素を担持してなり、前記酵素と前記被検液の反応に順しての物質濃度変化を前記電極系で検知し、前記被検液中の基質濃度を測定するバイオセンサ。

(2) 電極系が複数組の電極系からなり、前記複数組の電極系に各々対応した反応層と、共通の空間部を有してなる請求項1記載のバイオセンサ。

(3) 電極系が複数組の電極系からなり、前記複数組の電極系に対応した反応層と空間部を各々有してなる請求項1記載のバイオセンサ。

(4) 反応層が、酵素と親水性高分子からなる請

求項1、2または3記載のバイオセンサ。

(5) 反応層が、酵素と親水性高分子と電子受容体からなる請求項1、2または3記載のバイオセンサ。

(6) 空間部を構成する部材の表面が親水性を有してなる請求項1、2または3記載のバイオセンサ。

3、発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、種々の微量の生体試料中の特定成分について、試料液を希釈することなく迅速かつ簡便に定量することのできるバイオセンサに関する。

従来の技術

従来、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行なうことなく簡易に定量し得る方式として、特開昭61-294351号公報に記載のバイオセンサを提案した(第10図)。このバイオセンサは、絶縁性の基板51上にスクリーン印刷等の方法でカーボンなどからなる電極系52(52'), 53(53'),

54(54')を形成し、絶縁層55を設けた後、電極系の上を酸化還元酵素と電子受容体を担持した多孔体57で覆い保持層58とカバー58で全体を一体化したものである。試料液を多孔体上へ滴下すると、多孔体に担持されている酸化還元酵素と電子受容体が試料液に溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し電子受容体が還元される。反応終了後、この還元された電子受容を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。

発明が解決しようとする課題

この様な従来の構成では、電極系を含む基板面の濡れが必ずしも一様とならないため、多孔体と基板との間に気泡が残る、応答電流に影響を与えたり反応速度が低下する場合があった。また、周囲の温度が低いときには測定中に試料液の水分が蒸発し、応答の変動がみうけられた。

課題を解決するための手段

本発明は上記課題を解決するため、電極系と反応層を有する基板上に該反応層を含む空間部を形

成し、前記空間部に被検液を導入する導入口と、前記空間部の気体を前記被検液の流入によって排出する排出口設けたものである。

作用

本発明によれば、ごく僅かの被検液量で極めて容易に、かつ精度よく基質濃度を測定することのできるディスポーザブルタイプのバイオセンサを構成することができる。

実施例

以下、本発明を実施例により説明する。

(実施例1)

バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。

第1図は本発明のバイオセンサの一実施例として作製したグルコースセンサの分解斜視図であり、第2図はその外観図、また第3図は、第2図に示すバイオセンサを長手方向に中央部で切断した場合の断面図である。なお、第1図には、第3図に示す反応層14は示されていない。

以下に、センサの作製方法について説明する。

ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード2、3(3')を形成する。次に、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、測定極4、対極5(5')からなる電極系を形成する。さらに、電極系を部分的に覆い、電極の露出部分の面積を一定とし、かつリードの不要部を覆うように絶縁性ペーストを印刷し、加熱乾燥をして絶縁層6を形成する。

次に、電極系4、5(5')の露出部分を研磨後、空气中で100℃にて4時間熱処理を施した。このようにして電極部分を構成した後、親水性高分子として、カルボキシメチルセルロース(以下CMCと略す)の0.5wt%水溶液を電極上へ展開、乾燥しCMC層を形成する。次に、このCMC層を覆うように、酵素としてグルコースオキシダーゼ(GOD)をリン酸緩衝液に溶解したものを展開し、乾燥させ、CMC-GOD層からなる反応層14を形成した。この場合、CMCとGO

Dは部分的に混合された状態で厚さ数ミクロンの薄膜状となっている。

次に、この基板1と樹脂板からなるスペーサ7とカバー8の3つの部材について、第1図に示す様に、各部材間が磁線で示す位置関係になるように接合し、第2図の外観図に示すように一体化した。ここで、スペーサは約300μmの厚みを有し、その中央部を幅2mm、長さ7mmのU字型に切りとった形状をしており、切りとられた部分の端部は一体化したときに試料液の導入口10となり、中央部は空間部8を形成する。また、カバー8は直径2mmの穴を有しており、一体化したときに排出口11となる。

上記のように構成したグルコースセンサの先端の導入口を試料液であるグルコース標準液(200mg/dl)に接触させると、試料液は導入口10より内部へ導かれる。このとき空間部8内の空気は排出口11から速やかに排出され、同時に空間部は排出口近傍まで試料液で満たされた。このように試料液は電極面上を速やかに拡がり空間

部を覆たすため、気泡の残留は認められなかった。

これは、導入口と排出口を設けることにより試料液の流れが一方方向となり、また、電極上に予め形成された親水性高分子層により電極面の濡れが向上し、気液の交換が円滑に行なわれることによるものと考えられる。

さらに、カバーやスペーサなど、空間部を構成する部材の表面を界面活性剤で予め処理して親水性とすることにより、さらに円滑な試料液の導入が可能であった。

一方、添加された試料液はCMCを溶解し粘稠な液体となり、試料液中のグルコースは電極上に担持されたグルコースオキシダーゼの作用で酸素と反応して過酸化水素を生成する。そこで、試料液を導入して1分後に電極間に1Vの電圧を印加することにより、測定極をアノード方向へ分極した。上記のアノード方向への電圧印加により、生成した過酸化水素の酸化電流が得られた。この電流値は基質であるグルコースの濃度に対応する。

上記構成になるセンサの応答特性の一例として、

CMC-GOD層を形成するまでは実施例1と全く同様に作製した後、さらに以下に示す方法でCMC-GOD-電子受容体層からなる反応層を形成した。

電子受容体としてはフェリシアン化カリウムを用い、平均粒子が約 $10\mu m$ 以下のものをトルエン中にレシチンを用いて分散し、得られた分散液をCMC-GOD層上へ塗布した。この後、トルエンを蒸発させて、CMC-GOD-電子受容体層からなる反応層を電極系上に形成し、さらに実施例1と同様にしてスペーサ、カバーとともに一体化し、第2図に示す構造のグルコースセンサとした。

次に、前記同様にしてセンサ先端部分よりグルコース標準液を導入し、約1分後に両極間に800mVの電圧を印加することにより、酵素反応で生成したフェリシアン化カリウムを測定極で酸化し、このときの電圧印加5秒後の電流値を測定した。この結果、第4図Bに示す様にグルコース濃度と応答電流値の間に極めて良好な直線関係が得

電圧印加5秒後の電流値とグルコース濃度との関係を第4図Aに示すが、良好な応答特性が得られた。

また、上記と同一仕様のグルコースセンサ30ヶについて同じ試料液で試験したところ、変動係数は約5%と良好であった。

さらに、第10図に示す従来例の構成で試作したグルコースセンサとともに、濃度が30%と80%の条件下で、蒸発による影響についてそれぞれ10ヶのセンサを用いて比較検討したところ、本発明になるグルコースセンサにおいては5分放置後においてもその影響は無視し得るものであったが、従来構成のものについては低温度の方が2分後において約3%高値を示した。

以上のように、本発明になる上記構成のグルコースセンサは、微量の試料液をすくやかに反応領域へ投入し、周囲の湿度等による影響を受けることなく、簡易、迅速かつ高精度にグルコース濃度を測定することができる。

(実施例2)

られた。また、30ヶのセンサを用いて変動係数を調べたところ、グルコース標準液について2.6%、全血試料について3%と極めて良好な値を示した。また、蒸発の影響について実施例1と同様に試験したところ、前記同様の効果が得られた。

上記実施例において、導入口及び排出口を設けるにあたっては、第1図～第3図に示した配置以外に、第5図の分解斜視図および第6図の外観図に示すように、カバー9と基板1にそれぞれ穴を設けて導入口10と排出口11としてもよい。

また、第7図の分解斜視図に示すように、スペーサを7と7'の2つに分けることにより、空間部8と導入口10及び排出口11とすることもできる。

(実施例3)

実施例1と同様の方法により、第8図に示す電極部を構成した。すなわち、基板上に銀リード3、21、22、23とこれらに対応する対極5及び3ヶの測定極41、42、43を形成することにより、対極を共有する3組の電極系を構成した。

次に、各々の測定極近傍に実施例2と同様にしてCMC-GOD-フェリシアン化カリウム層からなる反応層を形成した。

次に、スペーサおよびカバーを実施例1と同様に接合して一体化した。ここで、スペーサはその一部が「くし状」に切りとられており、この切りとられた部分が空間部8を形成している。この空間部はそれぞれの電極系上に分割されているが、全体としては連続しており、共通の空間部となっている。また、導入口10となる。

これらの各電極系上に分割されて構成された空間部に対応して、カバー9には3ヶの穴をあけ排出口11、12、13を設けている。導入口10を試料液に接触させると、3ヶの排出口より空間部内の空気が排出されながら試料液は空間部内へ速やかに導入される。

実施例2と同様にして、グルコース標準液に対する応答を3ヶの電極系について測定し、その平均値を求めて1ヶのセンサの応答値とした。これを、30ヶの同一仕様の上記グルコースセンサに

板上に銀リード21、22、3とこれらに対応する測定極41、42と共通の対極5からなる2組の電極系を構成した。次に、実施例2と同様にして、CMC-GOD-フェリシアン化カリウム層からなる反応層を各々の電極系上へ形成した後、スペーサ7とカバー9を接合した。ここでスペーサは独立した空間部81、82となる2ヶの穴を有しており、これに対応する排出口11、12と共通の導入口10がカバーに設けてある。

上記構成のグルコースセンサについて、実施例3に述べたと同様に、グルコース標準液に対する2組の電極系の応答値を平均して1ヶのセンサの測定値とし、30ヶの同一仕様のセンサについて試験したところ、変動係数は2.2%と良好であった。

この様に、第9図に示すセンサにおいては、より高精度な測定ができるほか、独立した空間部を有しているので、1ヶのセンサで異なる試料液、あるいは時間や温度等の異なる条件下での測定に供することもできる。

について試験したところ、変動係数は2%と良好な値を示した。

ディスプレイ型タイプのセンサにおいては、各センサ毎の電極面積などの差異をはじめとする誤差要因をいかに小さくするかが信頼性向上において重要である。これらセンサ間の差異は同一試料液に対する測定値の差を生ずる原因となっている。しかしながら、上記のように、同一センサに複数の電極系を設け、その応答値の平均値を得ることにより、より高精度な測定を迅速に行うことができる。

第8図には3組の電極を有する例について示したが、これに限定されることはなく、さらに多数の電極系を設置することが可能である。また、空間部の形状については、電極系の形状や配置も同様であるが、図示したものに限定されるものではない。

(実施例4)

第9図に複数の電極系を有する構成の変形例を示す。すでに述べた実施例1と同様の方法で、蒸

上記においては、カバーに1ヶの穴を設けて共通の導入口としたが、この構成に限定されることはない。複数組の電極系と複数の独立した空間部からなる測定系を構成することが重要な点であり、2ヶの穴を設けて、それぞれの空間部に対する導入口を構成してもよい。

以上に述べた実施例1~4においては、空間部につながる導入口と排出口については、その好適な位置関係の一例を実施例として図示したものであり、排出口を導入口として、また導入口を排出口として用いてもよい。さらに、各々の図に示したスペーサおよびカバーは独立した部材からなっているが、成形などにより1ヶの一体部材とすれば製造上有利である。

また上記、空間部を構成する部材表面を親水性とすることにより、試料液の導入がより円滑となるが、このためには親水性の材料を用いるか、あるいは実施例に述べたように、予め界面活性剤で処理し親水性とすればよい。

一方、基板とカバーの間隔は、スペーサの厚み

あるいはこれに相当する部分の寸法を変えることによって調節することができるが、大きすぎると空間部を満たすに要する試料液が多くなり、また毛管現象による液導入にも支障をきたす。また、間隔が小さすぎると、電極間の抵抗の増大や電流分布の乱れを生ずる。以上の点から、間隔としては0.05～1.0mmが適当であり、さらに好ましくは0.1～0.5mmである。

実施例においては、親水性高分子としてCMCを用いたが、その役割は、すでに述べたように試料液の円滑な導入の他に、試料液に含まれる吸着性物質が電極へ吸着し応答に影響するのを防止することにある。

親水性高分子としてはCMCの他にゼラチンやメチルセルロースなども使用でき、デンプン系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系のものが好ましい。これらの吸水性あるいは水溶性の親水性高分子を適当な濃度の溶液にしたものを塗布、乾燥するこ

とにより、必要な膜厚の親水性高分子層を電極上に形成することができる。

なお、以上の実施例においては電極部分が測定極と対極の2電極からなる電極系について述べたが、電極系を参照極を加えた3電極から構成することにより、さらに精度を向上することができる。また、電極材料としては、実施例に示したカーボンは安定で安価な材料として適しているが、これに制限されることはなく、他の貴金属材料や酸化物材料を用いてもよい。

また、電子受容体としては、実施例に示したフェリシアン化カリウムは安定性や反応速度の点で優れたものであるが、これ以外に、例えばキノン系化合物やフェロセン系化合物などのレドックス化合物を用いることもできる。

さらに、酸化還元酵素としては上記実施例に示したグルコースオキシダーゼに限定されることはなく、アルコールオキシダーゼやコレステロールオキシダーゼなど種々の酵素を用いることができる。

発明の効果

以上のように本発明によれば、電極系と反応層を有する基板上に反応層を含む空間部を形成し、この空間部につながる試料液の導入口と気体の排出口を設けることにより、ごく僅かの換液量で極めて容易に、かつ精度よく基質濃度を測定することのできる安価なディスポーザブルタイプのバイオセンサを提供することができる。

4、図面の簡単な説明

第1図は本発明の一実施例であるバイオセンサの分解斜視図、第2図はその外観図、第3図はその断面模式図、第4図はバイオセンサの応答特性図、第5図は別の実施例であるバイオセンサの分解斜視図、第6図はその外観図、第7図、第8図および第9図はさらに別の実施例であるバイオセンサの分解斜視図、第10図は従来のバイオセンサの分解斜視図である。

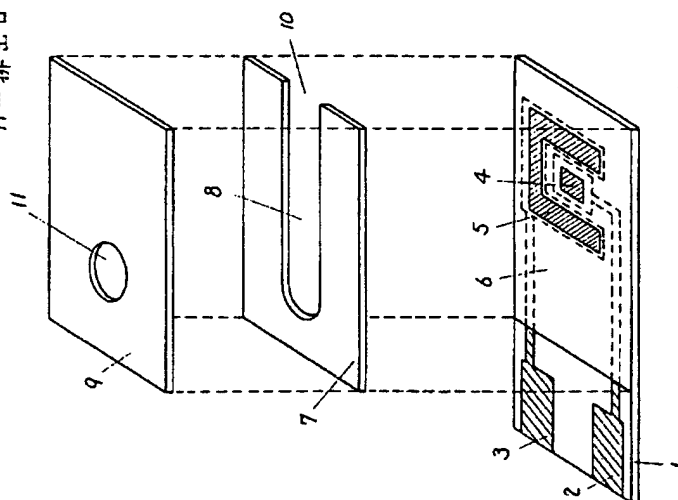
1, 51……基板、2, 3, 3', 21, 22, 23, 52, 53, 54……リード、4, 41, 42, 43, 53'……測定極、5, 5', 52

……対極、6, 55……絶縁層、7, 7'……スペース、8, 81, 82……空間部、9, 58……カバー、10……導入口、11, 12, 13……排出口、14……反応層、54'……参照極、56……保持枠、57……多孔体、。

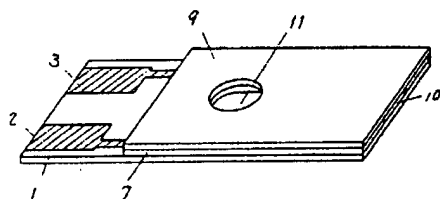
代理人の氏名 弁理士 中尾敏男 はか1名

- 1...基板
2,3...リード
4...測定極
5...対極層
6...絶縁層
7...スベ-サ
8...空孔部
9...導入口
10...導出口
11...排出口

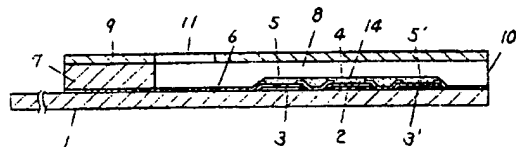
第1図



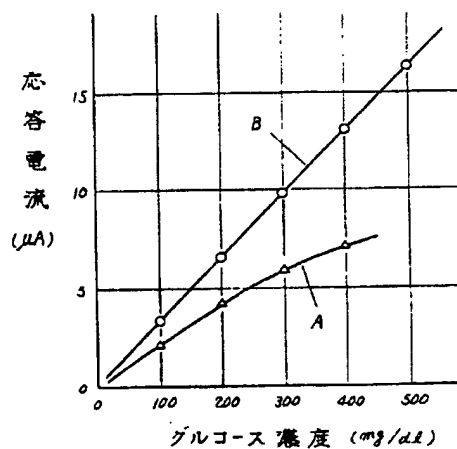
第2図



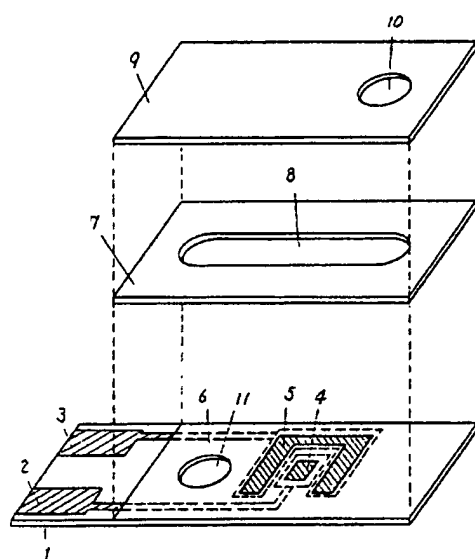
第3図



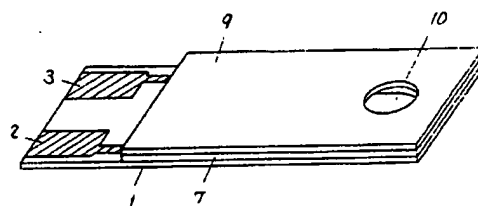
第4図



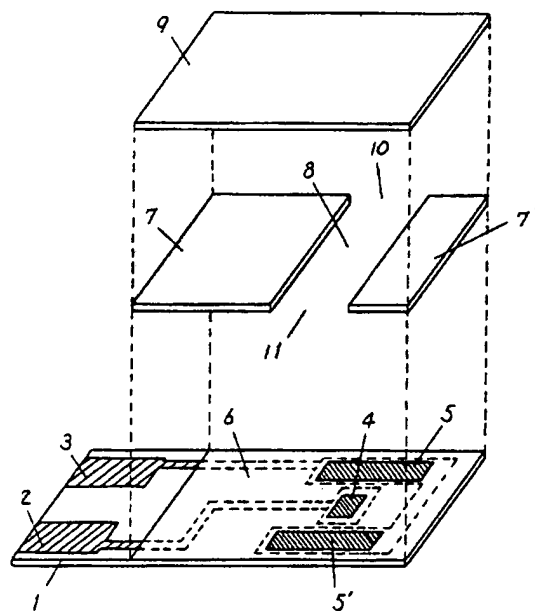
第 5 図



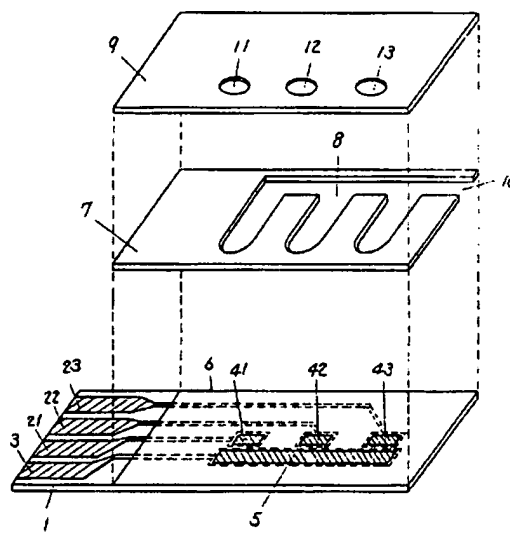
第 6 図



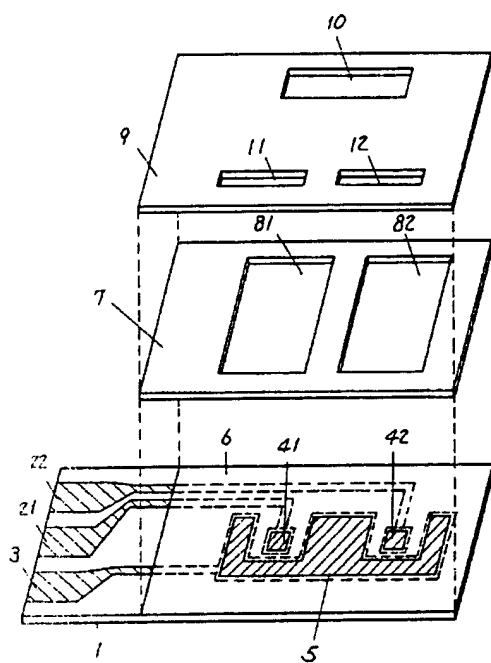
第 7 図



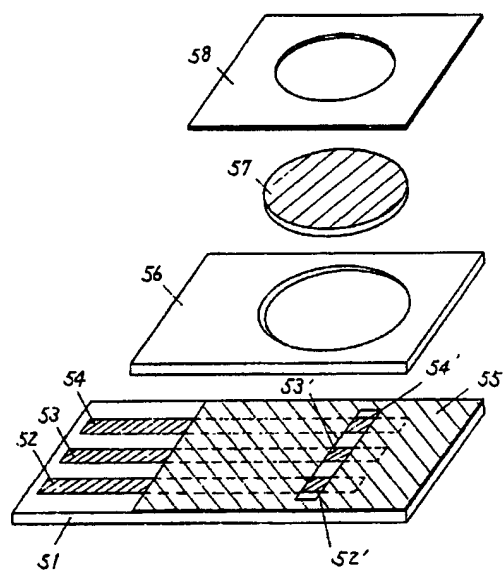
第 8 図



第 9 図



第 1 0 図



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第6部門第1区分
 【発行日】平成5年(1993)8月24日

【公開番号】特開平1-291153
 【公開日】平成1年(1989)11月22日
 【年通号数】公開特許公報1-2912
 【出願番号】特願昭63-121002
 【国際特許分類第5版】

G01N 27/28 331 A 7235-2J
 27/327

【F I】

G01N 27/30 353 J 7235-2J
 R 7235-2J

手続補正書

平成 4 年 7 月 16 日

特許庁長官殿

1 事件の表示

昭和63年 特 許 願 第 121002号

2 発明の名称

バイオセンサ

3 補正をする者

事件との関係 特 許 出 願 人

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地

名 称 (582)松下電器産業株式会社

代表者 谷 井 昭 雄

4 代 理 人 〒571

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地

松下電器産業株式会社内

氏 名 (7242) 井 堀 士 小 堀 治 明
 (ほか2名)

[連絡先電話(03)3434-9471 知財財産センター]

5 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6 補正の内容

(1) 明細書第3頁第8行の「電子受容を」を「電子受容体を」に補正します。

(2) 同第4頁第3行の「排出口設けた」を「排出口を設けた」に補正します。

(3) 同第7頁第17行~第18行の「生成し過酸化水素の酸化電流が得られた。」を「酵素反応で生成した過酸化水素が測定電極で酸化され、これにともなう酸化電流が得られた。」に補正します。

(4) 同第8頁第4行の「グルコーセンサス」を「グルコースセンサ」に補正します。

(5) 同第10頁第5行と第6行の間に「上記においては、CMC、GOD、電子受容体の層を順次形成して反応層を作成したが、これら3成分の混合水溶液を電極上へ展開、乾燥することにより、均質な反応層を製造することができた。このようにして得られたセンサ30箇について前記同様にグルコース標準液に対する応答電流値を測定したところ、変動係数は2.3%と良好であった。」

を挿入します。

(6) 同第12頁第17行と第18行の間に
「さらに、上記3組の電極系に各々異なる酸化還元
酵素を担持することにより、1箇のセンサで多
成分を同時に計測しうるマルチセンサを構成する
ことができる。」を挿入します。

(7) 同第14頁第15行の「新水性」を「親
水性」に補正します。